

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-090796
(43)Date of publication of application : 05.04.1994

(51)Int.Cl. C12Q 1/68
// (C12Q 1/68
C12R 1:01)

(21)Application number : 04-037189 (71)Applicant : TOAGOSEI CHEM IND CO LTD
(22)Date of filing : 28.01.1992 (72)Inventor : HAYASHI TAKAKO
YOSHIDA MASAO
TERADA KENJI

(54) PROBE FOR DETECTING CAMPYLOBACTER JEJUNI AND COLI AND METHOD FOR DETECTING THE SAME

(57)Abstract:

PURPOSE: To conduct the detection quickly and accurately in clinical examinations, esp. those involving food poisoning or food examinations.

CONSTITUTION: The objective probe consisting of a probe for a DNA or RNA nucleic acid having a specific sequence. The second objective method for detecting *Campylobacter jejuni* and *coli* using this probe. With this probe, *Campylobacter jejuni* and *coli* can be detected quickly and accurately; besides, there is no need for any medium for specimen transport.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

* NOTICES *

JP0 and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Campyrobacter characterized by being DNA or the RNA nucleic acid probe which has the following array or its complementary sequence JIEJUNI (Campylobacter jejuni) and probe for KORI (coli) detection.

10 20 30 40 50 XAAACGAXGX ACACXAGXXG XXGGGGXGCX AGXCAXCXCA GXAAAXGCAGC
60 70 XAACGCAXXA AGXGXACCGC CXG (in the Case [In the Case of DNA Array] of
X=T:RNA Array X=U)

[Claim 2] It is Campyrobacter characterized by being 15-35 which are guided from the array indicated by claim 1, DNA which has the array of 18 to 24 nucleotide, or its complementary sequence preferably, or an RNA nucleic acid probe. JIEJUNI (Campylobacter jejuni) and probe for KORI (coli) detection.

[Claim 3] Campyrobacter indicated by claim 1 or 2 Campyrobacter characterized by carrying out hybridization of JIEJUNI (Campylobacter jejuni) and the probe for KORI (coli) detection to the nucleic acid belonging to the stock which denaturalized when required at first in the case of the duplex chain, and which should be identified, and performing alternative detection or identification JIEJUNI (Campylobacter jejuni) and the KORI (coli) detection approach.

[Translation done.]

* NOTICES *

JP0 and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention is Campyrobacter in a clinical laboratory test especially the inspection concerning food poisoning, or food evaluation. It is related with detection of JIEJUNI (Campylobacter jejuni) and KORI (coli).

[0002]

[Description of the Prior Art] Although Campylobacter is not related with the cause of diseases, such as a man or a miscarriage of an animal, septicemia, and fecundity ileitis, and the check is not yet carried out to Campyrobacter, the microorganism similar to Campyrobacter is isolated from the homosexual's excrement (J.Infec.Dis. 149: Fennel et al (1984), 58) and gastric ulcer biopsy (12: Kasper et al (1984), Infection, and 179). Furthermore, Campyrobacter It is supposed that it is JIEJUNI and KORI one of the important reasonable strains constituting diarrhea (Blaser et al (1979), Ann.Intern.Med.91; 179) of people and the cause of pneumonia (Morris et al (1985), Manual of Medical Microbiology, Lennette et al, American Sciaty for Microbiology, Washington.D.C.).

[0003] Existence of Campyrobacter in a clinical sample is detected by the following approaches. That is, the sample prepared appropriately first is cultivated on the microbiological culture medium under the conditions suitable for growth. It is the approach of taking several days to start and end generally about the colony obtained by culture in 48 hours after extraction of a sample of checking the existence, morphological and by inspecting the biological description.

[0004] However, by the above-mentioned approach, it has the problem that there are many points difficult also on a technique besides the thing for which it takes time amount too much -- the environment of microaerophile nature is required of culture. So, recently, the DNA probe method or hybridization method which used the oligonucleotide has come to be tried. for example, Kohne[-- one approach Biochemical Journal 8:1104-1118(1968)] and others prepares the probe of a rRNA array -- arguing -- **** -- Pace and Campbell[-- Journal of Bacteriology 107 : 543-547(1971)] It is arguing about the hybridization method for quantifying extent of the homology of rRNA from a different bacteria kind, and such homology. Sogin[Journal of Molecular Evolution 1 [furthermore,] : the primary-structure property of a different ribosomal RNA molecule for phylogeny theory-related evaluation is used for 173-184(1972)] and others -- a logical and practical viewpoint -- arguing -- **** -- Fox[International Journal of Systematic Bacteriology 27 : 44-57(1977)] ** -- it is arguing about the comparison catalog method to a procaryote classification. moreover, Kohne ** -- Gen-Probe The strategy for obtaining the nucleic-acid fragment for using it as a probe to a ribosomal RNA molecule in an application patent (1983) of a shrine is described.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] DNA or RNA by which this invention may be used for the DNA probe method or hybridization method which used the oligonucleotide, It is especially Campyrobacter. If required when it is a double chain at the beginning used in order to detect 16SrRNA gene of JIEJUNI and the KORI origin The complementary DNA belonging to the stock which denaturalized beforehand and which should be identified Or Campyrobacter which carries

out hybridization to an RNA array JIEJUNI, the oligonucleotide probe for KORI detection, and Campyrobacter in causative-micro-organisms-of-food-poisoning inspection It is going to offer detection method [that JIEJUNI and KORI are simple and high sensitivity].

[0006]

[Means for Solving the Problem] this invention person etc. searches widely about DNA or RNA which may be used for the DNA probe method or hybridization method which used the oligonucleotide, and is Campyrobacter. It succeeded in creation of the oligonucleotide hybridized on 16SrRNA gene and the selection target of JIEJUNI and KORI, and this invention was completed.

[0007] That is, this invention consists of the following three invention.

** Campyrobacter characterized by being DNA or the RNA nucleic acid probe which has the following array or its complementary sequence Invention about JIEJUNI (Campylobacter jejuni) and the probe for KORI (coli) detection. 10 20 30 40 50 XAAACGAXGX ACACXAGXXG XXGGGGXGCX AGXCAXCXCA GXAAAXGCAGC60 70 XAACGCAXXA AGXGXACCGC CXG (in the Case [In the Case of DNA Array] of X=T:RNA Array X=U)

** It is Campyrobacter characterized by being 15-35 which are guided from the array indicated by claim 1, DNA which has the array of 18 to 24 nucleotide, or its complementary sequence preferably, or an RNA nucleic acid probe. Invention about JIEJUNI (Campylobacter jejuni) and the probe for KORI (coli) detection.

** Campyrobacter indicated by the above-mentioned ** or ** Campyrobacter characterized by carrying out hybridization of JIEJUNI (Campylobacterjejuni) and the probe for KORI (coli) detection to the nucleic acid belonging to the stock which denaturalized when required at first in the case of the duplex chain, and which should be identified, and performing alternative detection or identification Invention about JIEJUNI (Campylobacterjejuni) and the KORI (coli) detection approach.

[0008] This invention is explained more below at a detail for an understanding of this invention. The probe in probe this invention is Campyrobacter. It can acquire from JIEJUNI, KORI DNA, or a ribosome, or can compound by in vitro. In order to use it effective in detection assay, the probe of 15 or more bases has the desirable die length of a probe. that to which that [the probe's] by which the indicator is carried out by the well-known approach of generally enabling those detection was desirable, and, as for the desirable DNA probe, the radiation indicator was carried out for example, using 32P grade -- or a nonradioactive indicator is given using a compound alternatively combinable with the directions matter which forms a detectable compound or detectable complex. As said complex, avidin, a biotin and an antigen, an antibody, and an enzyme and a compound like the substrate corresponding to it are mentioned. As another non-isotopic labeling, a fluorescence compound, a compound with high electron density, acridine ester, and luminescence lanthanides are mentioned.

[0009] The probe of this invention is Campyrobacter. It is a nucleic acid probe for using for detection and identification of a bacteria microorganism of JIEJUNI and KORI, and the probe of this invention is Campyrobacter in accuracy more. They are DNA which consists of a unique array of DNA or RNA useful in order to detect and identify various bacteria kinds of JIEJUNI and KORI specifically by which the indicator was carried out respectively preferably, or an RNA nucleic acid probe, i.e., Campyrobacter. It is the specific probe of JIEJUNI and KORI.

Campyrobacter of this invention The specific probe of JIEJUNI and KORI is characterized by having the following array or its complementary sequence (it coming to exchange C and G on X, A, and another side by one side).

10 20 30 40 50 XAAACGAXGX ACACXAGXXG XXGGGGXGCX AGXCAXCXCA GXAAAXGCAGC 60 70 XAACGCAXXA AGXGXACCGC CXG (in the Case [In the Case of DNA Array] of X=T:RNA Array X=U)

It is characterized by 15-35 which are guided to a list from the array indicated above, and having the array of 18 to 24 nucleotide, or its complementary sequence (it coming to exchange C and G on X, A, and another side by one side) preferably. Preferably, 15-35 which are guided from the array indicated above, and the probe with which indicator oligomer ** of 18 to 24 nucleotide consists of complementary oligomer are probes desirable for this invention, and, specifically, the

following array is mentioned.

10	20	30
• ACATGTGATC AACAAACCCA CGATCAGTAG AGTCA		
10	20	30
• AACCCCACGA TCAGTAGAGT CATTACGTCG		
10	20	30
• GAGTCATTAC GTCGATTGCG TAATTACACAT GGC		

[0010] Acquisition with a well-known present condition technique is possible for these nucleic acid probes, and they are obtained by various roots especially gene engineering, the direct manual, or automatic composition.

[0011] For rRNA of other living things, acquisition of a probe, the synthetic this invention person, etc. are Campyrobacter without homology first. Reverse transcriptase was used, and rRNA of JIEJUNI and KORI and the complementary DNA array were isolated, and were identified. Reverse transcriptase is the approach of using RNA as mold, imprinting it and making a complementary DNA strand (cDNA), and was able to compound Campylobacter jejuni and rRNA to cDNA of KORI by using this enzyme. After identifying the DNA fragment which carries out the cord of the 16SrRNA(s) by hybridization, the nucleotide sequence of those DNA was determined by the standard approach (for example, Sanger et al, 74: 5453 (1977), Proc.Natl.Acad.Sci). The homology region and the heterology field were determined as compared with other various rRNA arrays released to the degree in this nucleotide sequence. The formation of a subclone or an oligonucleotide automatic synthesizer unit is used for a field without the array and homology of the others released, and it is Campyrobacter. The DNA fragment of JIEJUNI and KORI was obtained. These characteristic Campyrobacter The indicator of the DNA fragment of JIEJUNI and KORI is carried out using 32P or 35S, and it is Campyrobacter. JIEJUNI, KORI, and non-Campyrobacter It can be used as a probe for examining to JIEJUNI. Moreover, if , a probe array can be included in a vector and the obtained vector can also be used as a probe. The vector used for this is non-Campyrobacter which may exist in the sample examined. Don't have homology in neither of JIEJUNI.

[0012] Campyrobacter The array of a probe specific to JIEJUNI and KORI is explained below. The array number 1 in a (array table) is Campyrobacter. The nucleotide sequence of one part of JIEJUNI and 16SrRNA(s) of KORI is shown. This array is computer program FTgenetics (GENETYX). It uses and they are two kinds of data banks. GenBank (the U.S.Department of Health and HumanServices) It is non-Campyrobacter when it compares with the nucleic-acid array indicated by EMBL (European Molecular Biology Laboratory). It is the part in which certainly differing in the field of JIEJUNI and KORI, and a base some was checked.

[0013] Although the probe of this invention has the above-mentioned array, it is not limited only to them and, in addition to the array shown in the array number 1, also contains a probe with 15-35 which are guided from those arrays, and the array preferably constituted by the oligomer or complementary oligomer of 18 to 24 nucleotide. These probes can also be used combining two or more kinds of probes.

[0014] How to compound polynucleotide pro-BU using an oligonucleotide automatic synthesizer unit is explained below. Polynucleotide pro-BU of 34 nucleotide chain length with the following convention array was compounded by the thio phosphite method (JP,61-180002,A). When composition was completed, the polynucleotide was separated from support, the specified substance was able to be isolated preparatively by HPLC using C18 column by the known chromatography method, and the polynucleotide with about 99% of purity was able to be obtained. As compared with the standard polynucleotide of 35 bases, generation was checked for the created polynucleotide by electrophoresis.

This polynucleotide after checking that the base sequence of the polynucleotide created by the approach of 5 '– ACATGTGATC AACAAACCCA CGATCAGTAG AGTCA –3' above is right with a known dideoxy chain termination method is Campyrobacter. It investigated whether it would combine with JIEJUNI and 16SrRNA(s) of KORI. First, Campyrobacter 16SrRNA(s) were

extracted from JIEJUNI a phenol chloroform extraction and by operating ethanol precipitation etc. It checked that mixed the created probe with this, made reverse transcriptase act under alpha-35 S-dATP existence, this probe became a primer, and the cDNA expanding reaction was advancing using approaches, such as an electrophoresis method and autoradiography. It checked that created polynucleotide pro-BU checked 16SrRNA(s) made into the target, and was combinable with this result.

[0015] If these nucleic-acid arrays are required when it is a duplex chain at first, they have the property which forms the complementary DNA or the RNA array which denaturalized, and a hybrid. Incubation in a basic culture medium, the rise of culture-medium temperature, and these 2 process can combine the denaturation of a nucleic acid, or an operation of microwave can perform it again. Hybrid formation can be performed by various approaches.

[0016] The indicator of the probe of this invention is carried out to this contractor about the indicator of a nucleic acid probe by one of the well-known approaches. For example, this is also well-known, although an indicator is carried out with the radioisotope of 32P grade or an indicator is carried out with nonradioactive isotopes, such as an enzyme. In a certain case, although the indicator of the probe is not carried out with an enzyme, it is chemically embellished with the biotin which can exist for example, after hybridization.

[0017]

[Function] all Campyrobacter to which, as for the probe of this invention, this probe exists in a sample forming nucleic-acid hybrid complex and detecting this complex by contacting this probe to the bacteria in a sample, under the conditions rRNA of JIEJUNI and KORI and whose hybridization become possible, -- Campyrobacter in a sample existence of JIEJUNI and KORI -- being detectable -- Campyrobacter in a sample it is proof about existence of JIEJUNI and KORI -- it can shine. Especially almost all genes consist of compound mixture of rRNA[protein and RNA. In all living things, participate in translation of genetic information, and it has the multiplex copy of] to which three sorts of different ribosomal RNA molecules exist in bacteria (5S, 16S, 23S) (Noller (1984) Ann.Rev.Biochem.53: 119). Various bacterial cells are about 1.2x10⁴. Since the ribosome of an individual is included, any cell is at least 1.2x10⁴. As opposed to each rRNA of a molecule being included Since other genes in bacteria only recognize 1-2 copy existence per cell, and the mRNA product is not stable and it moreover does not always imprint, Detection of rRNA by hybridization is about 10⁴ to the hybridization to DNA of other genes. Twice sensibility will be good.

[0018]

[Example] Three sorts of probes (CCJ31, CCJ32, and CCJ33) which have the array shown in the array number 1 and the following arrays with homology are compounded by the above-mentioned thio phosphite approach, and it is Campyrobacter by hybridization assay. The identification trial was performed about JIEJUNI, KORI, non-Campylobacter jejuni, and KORI.

10 20 30

CCJ31; ACATGTGATC AACAAACCCA CGATCAGTAG AGTCA

10 20 30

CCJ32; AACCCACGA TCAGTAGAGT CATTACGTCG

10 20 30

CCJ33; GAGTCATTAC GTCGATTGCG TAATTACAT GGC

The result of a trial was shown in Table 1. These probes are Campyrobacter so that clearly [in Table 1]. A specific thing is shown in JIEJUNI and KORI, and it is non-Campyrobacter. With DNA of JIEJUNI and the KORI origin, or RNA, hybridization was hardly performed. In addition, non-Campyrobacter shown in Table 1 The bacillus of JIEJUNI and KORI is Campyrobacter. In inspection of JIEJUNI and KORI, it is a part of the strains which can serve as a subject of examination.

[0019]

[Table 1]

表1 細菌類の検出

	プローブ		
	CCJ31	CCJ32	CCJ33
カンピロバクター コリ	+	+	+
カンピロバクター ジェジュニ47	+	+	+
カンピロバクター ジェジュニ48	+	+	+
大腸菌	-	-	-
サルモネラ	-	-	-
リステリア	-	-	-
黄色ブドウ球菌	-	-	-
黄色ブドウ球菌TSS-1	-	-	-
緑膿菌	-	-	-

[0020]

[Effect] Campylobacter using the probe of this invention Detection of JIEJUNI and KORI gives a quick and exact result, is the laboratory of clinical or food, and is Campylobacter in a sample to the inside of a short time. The existence of JIEJUNI and KORI can be investigated. Moreover, the detection approach of this invention is Campylobacter in order to be dependent on the bacterial nucleic-acid content instead of a biological property with much other various fluctuation. Not only a typical kind but a non-type-kind is biologically [JIEJUNI and KORI] detectable, and further, since this detection approach does not need the cell which not necessarily survives for detection, it does so the outstanding effectiveness that the need for the transport medium for transportation of a sample to a laboratory is remove.

[0021]

[Layout Table] array number: --- die-length [of one array]: --- mold [of 73 arrays]: --- number [of nucleic-acid chains]: --- single strand topology: --- class [of straight chain-like array]: --- 16SrRNA array XAAACGAXGX ACACXAGXXG XXGGGGXGCX AGXCAXCXCA GXAAAXGCAGC XAACGCAXXA 60 AGXGXACCGC CXG 73

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) **公開特許公報 (A)**

(11)特許出願公開番号

特開平6-90796

(43)公開日 平成6年(1994)4月5日

(51)Int.Cl.⁵

C 1 2 Q 1/68

// (C 1 2 Q 1/68

C 1 2 R 1:01)

識別記号 庁内整理番号

Z N A A 7823-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数3(全5頁)

(21)出願番号

特願平4-37189

(22)出願日

平成4年(1992)1月28日

(71)出願人 000003034

東亞合成化学工業株式会社

東京都港区西新橋1丁目14番1号

(72)発明者 林 貴子

愛知県名古屋市港区船見町1番地の1 東亞
合成化学工業株式会社名古屋総合研究所内

(72)発明者 吉田 ▲祇▼生

茨城県つくば市大久保2番東亞合成化学工
業株式会社つくば研究所内

(72)発明者 寺田 建司

愛知県名古屋市港区船見町1番地の1 東亞
合成化学工業株式会社名古屋総合研究所内

(54)【発明の名称】 カンピロバクター ジェジュニ及びコリ検出用プローブ及び検出方法

(57)【要約】

【目的】臨床検査、事に食中毒にかかる検査、あるいは
食品検査における、カンピロバクター ジェジュニ (Campylobacter jejuni) 及びコリ (coli) の検出を迅速かつ正確に行うことを目的とするものである。

【構成】特定配列を有するDNA又はRNA核酸プローブからなるカンピロバクター ジェジュニ (Campylobacter jejuni) 及びコリ (coli) 検出用プローブ及び該プローブを用いるカンピロバクター ジェジュニ (Campylobacter jejuni) 及びコリ (coli) 検出方法。

【効果】カンピロバクター ジェジュニ及びコリの検出
が迅速かつ正確に行えるほか、標本の輸送のための輸送
培地の必要性もない。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記配列又はその相補的配列を有するDNA又はRNA核酸プローブであることを特徴とする

10	20	30
XAAACGAXGX	ACACXAGXXG	XXGGGGXGCX
60	70	40
XAAACGCAXXA	AGXGXACCGC	50
CXG		GXAAXGCAGC

(DNA配列の場合 X = T : RNA配列の場合 X = U)

【請求項2】 請求項1に記載された配列から誘導される15~35、好ましくは18~24ヌクレオチドの配列又はその相補的配列を有するDNA又はRNA核酸プローブであることを特徴とするカンピロバクター ジェジュニ (Campylobacter jejuni) 及びコリ (coli) 検出用プローブ。

【請求項3】 請求項1又は2に記載されたカンピロバクター ジェジュニ (Campylobacter jejuni) 及びコリ (coli) 検出用プローブを、最初二重鎖の場合に必要であれば変性した同定されるべき株に属する核酸とハイブリッド形成させて選択的検出又は同定を行うことを特徴とするカンピロバクター ジェジュニ (Campylobacter jejuni) 及びコリ (coli) 検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、臨床検査、特に食中毒にかかる検査、あるいは食品検査における、カンピロバクター ジェジュニ (Campylobacter jejuni) 及びコリ (coli) の検出に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 カンピロバクター属は、人、あるいは動物の流産、敗血症、及び増殖性回腸炎などの疾患の原因に関連付けられるものであり、又、カンピロバクターとは未だ確認はされていないが、カンピロバクターに類似した微生物が、同性愛者の排泄物 (Fennel et al, (1984) *J. Infect. Dis.* 149: 58) 及び胃潰瘍生検 (Kasper et al, (1984) *Infection*, 12: 179) から単離されている。更に、カンピロバクター ジェジュニ及びコリは、人の下痢 (Blaser et al, (1979) *Ann. Intern. Med.* 91: 179) 及び肺炎 (Morris et al, (1985) *Manual of Medical Microbiology*, Lennette et al, *American Society for Microbiology*, Washington, D. C.) の原因となるもっとも重要な菌種のひとつであるとされているものである。

【0003】 臨床標本中のカンピロバクターの存在は、以下の方法で検出されている。即ち、まず、適切に調製した試料を増殖に適した条件下の微生物学的培地上で培養する。培養により得られたコロニーについて、一般的に試料の採取後48時間に開始し、終了するのに数日を要する形態学的及び生物学的特徴を検査することにより、その存在を確認するという方法である。

【0004】 しかし、上記の方法では、培養に微好気性

カンピロバクター ジェジュニ (Campylobacter jejuni) 及びコリ (coli) 検出用プローブ。

30	40	50
----	----	----

XXGGGGXGCX

AGXCAXCXCA

GXAAXGCAGC

の環境が要求されるなど、時間が掛かり過ぎることの他に、技術上にも困難な点が多いという問題を有している。そこで、最近では、オリゴヌクレオチドを用いたDNAプローブ法あるいはハイブリダイゼーション法が試みられるようになってきた。例えば、Kohne [Biochemica I Journal 8: 1104-1118(1968)] らは、rRNA配列のプローブを調製する1つの方法について議論しており、PaceおよびCampbell [Journal of Bacteriology 107: 543-547(1971)] は、異なる細菌種からのrRNAの相同性及びこれらの相同性の程度を定量化するためのハイブリダイゼーション法について議論している。更に、Sogin [Journal of Molecular Evolution 1: 173-184(1972)] らは、系統発生論関係の評価のために異なるリボゾームRNA分子の一次構造特性を用いる論理的および実際的観点について議論しており、Fox [International Journal of Systematic Bacteriology 27: 44-57(1977)] らは、原核生物分類への比較カタログ法について議論している。又、Kohne らは、Gen-Probe 社の出願特許 (1983) 中で、リボゾームRNA分子に対するプローブとして使用するための核酸断片を得るための戦略について述べている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、オリゴヌクレオチドを用いたDNAプローブ法あるいはハイブリダイゼーション法に使用され得るDNA又はRNA、特にカンピロバクター ジェジュニ及びコリ由来の16S rRNA遺伝子を検出するために用いられる、最初2重鎖である場合に必要であれば、予め変性された同定されるべき株に属する相補的DNAまたはRNA配列とハイブリッド形成するカンピロバクター ジェジュニ及びコリ検出用オリゴヌクレオチドプローブ及び食中毒菌検査におけるカンピロバクター ジェジュニ及びコリの簡便且つ高感度な検査法を提供しようとするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、オリゴヌクレオチドを用いたDNAプローブ法あるいはハイブリダイゼーション法に使用され得るDNA又はRNAについて広く探索し、カンピロバクター ジェジュニ及びコリの16S rRNA遺伝子と選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの作成に成功し本発明を完成させたのである。

【0007】 即ち、本発明は以下の3発明からなるものである。

① 下記配列又はその相補的配列を有するDNA又はRNA核酸プローブであることを特徴とするカンピロバクター ジェジュニ (Campylobacter jejuni) 及びコリ (coli) 検出用プローブに関する発明。10 20
30 40 50XAAACGAXGX ACACXAG

XXG XXXGGGXGCG AGXCAXCXCA GXAAAGCAGC60 70X
AACGCAXXA AGXGXACCGC CXG (DNA配列の場合 X =
T : RNA配列の場合 X = U)

② 請求項1に記載された配列から誘導される15~35、好ましくは18~24ヌクレオチドの配列又はその相補的配列を有するDNA又はRNA核酸プローブであることを特徴とするカンピロバクター ジェジュニ (Campylobacter jejuni) 及びコリ (coli) 検出用プローブに関する発明。

③ 上記①又は②に記載されたカンピロバクター ジェジュニ (Campylobacter jejuni) 及びコリ (coli) 検出用プローブを、最初二重鎖の場合に必要であれば変性した同定されるべき株に属する核酸とハイブリッド形成させて選択的検出又は同定を行うことを特徴とするカンピロバクター ジェジュニ (Campylobacter jejuni) 及びコリ (coli) 検出方法に関する発明。

【0008】本発明の理解のために以下に本発明をより詳細に説明する。

プローブ

本発明におけるプローブは、カンピロバクター ジェジュニ又はコリDNA或いはリボゾームから取得するか、

10	20	30	40	50
XAAACGAXGX ACACXAGXXG XXGGGGXGCG AGXCAXCXCA GXAAAGCAGC				
60	70			
XAACGCAXXA AGXGXACCGC CXG				

(DNA配列の場合 X = T : RNA配列の場合 X = U)

並びに、上記に記載された配列から誘導される15~35、好ましくは18~24ヌクレオチドの配列又はその相補的配列（一方でX及びAかつ他方でC及びGを交換してなる）を有することを特徴とするものである。上記に記載された配列から誘導される15~35、好ましくは18~24ヌクレオチドの標識オリゴマー又は相補的オリゴマーから構成されるプローブは、本発明にとり好ましいプローブであり、具体的には、下記の配列が挙げられる。

10	20	30
• ACATGTGATC AACAAACCCA CGATCAGTAG AGTCA		
10	20	30
• AACCCCCACGA TCAGTAGAGT CATTACGTCG		
10	20	30
• GAGTCATTAC GTCGATTGCG TAATTCACAT GGC		

【0010】これらの核酸プローブは周知の現状技術で取得可能なものであって、様々なルート、特に遺伝子工学又は直接的マニュアル、もしくは自動合成によって得

あるいはin vitroで合成することが出来る。検出アッセイに有効に使用するためには、プローブの長さが15塩基以上のプローブが好ましい。プローブは一般的にそれらの検出を可能にする公知の方法により標識されているものが好ましく、好ましいDNAプローブは、例えば32P等を用いて放射線標識がされたものとか、あるいは検出可能な化合物又は複合体を形成する指示物質に選択的に結合することのできる化合物を用いて非放射性標識を施されたものである。前記複合体としては、アビジンとビオチン、抗原と抗体、及び酵素とそれに対応する基質の様な化合物が挙げられる。別の非同位体標識としては、蛍光化合物、電子密度の高い化合物、アクリジンエスチル類及び発光ランタニド類が挙げられる。

【0009】本発明のプローブは、カンピロバクター ジェジュニ及びコリの細菌微生物の検出及び同定に用いるための核酸プローブであり、より正確には、本発明のプローブは、カンピロバクター ジェジュニ及びコリの様々な細菌種を特異的に検出及び同定するために有用な、各々好ましくは標識されたDNAまたはRNAの特異配列からなるDNAまたはRNA核酸プローブ、即ち、カンピロバクター ジェジュニ及びコリの特異的プローブである。本発明のカンピロバクター ジェジュニ及びコリの特異的プローブは、下記配列又はその相補的配列（一方でX及びAかつ他方でC及びGを交換してなる）を有することを特徴とするものである。

10	20	30	40	50
XAAACGAXGX ACACXAGXXG XXGGGGXGCG AGXCAXCXCA GXAAAGCAGC				
60	70			
XAACGCAXXA AGXGXACCGC CXG				

られる。

【0011】プローブの取得と合成

本発明者等は、まず、他の生物のrRNAとは相同性を持たないカンピロバクター ジェジュニ及びコリのrRNAと相補的なDNA配列を、逆転写酵素を使用して、単離し同定した。逆転写酵素はRNAを録型として使い、それを転写して相補的なDNA鎖(cDNA)を作る方法であり、この酵素を用いることにより、カンピロバクター ジェジュニ及びコリのrRNAからcDNAを合成することが出来た。ハイブリッド形成により16SrRNAをコードするDNAフラグメントを同定した後、それらのDNAのヌクレオチド配列を標準的方法（例えばSanger et al., 74: 5453 (1977), Proc. Natl. Acad. Sci.)により決定した。このヌクレオチド配列を、次に、公表されている他の種々のrRNA配列と比較し、相同性領域及び非相同性領域を決定した。公表されている他の配列と相同性の無い領域をサブクローン化又はオリゴヌクレオチド自動合成装置を用いてカンピロバクター ジェジュニ及びコリのDNAフラグメントを得た。これらの特徴的なカンピロバクター ジェジュニ及びコ

りのDNAフラグメントを ^{32}P もしくは ^{35}S を用いて標識し、カンピロバクター・ジェジュニ、コリ及び非カンピロバクター・ジェジュニに対して試験するためのプローブとして使用することが出来る。又、必要なら、プローブ配列をベクターに組み込み、得られたベクターをプローブとして用いることも出来る。これに使用するベクターは、試験される試料中に存在する可能性のある非カンピロバクター・ジェジュニのいずれにも相同性を有してはならない。

【0012】カンピロバクター・ジェジュニ及びコリに特異的なプローブの配列について以下に説明する。(配列表)における配列番号1は、カンピロバクター・ジェジュニ及びコリの16S rRNAの1部分のヌクレオチド配列を示している。この配列はコンピュータープログラム・ジェネティックス(GENETYX)を用いて、2種類のデータバンク GenBank (the U.S. Department of Health and Human Services)とEMBL (European Molecular Biology Laboratory)に記載されている核酸配列と比較した際、非カンピロバクター・ジェジュニ及びコリと塩基数個の領域で確実に異なることが確認された部分である。

【0013】本発明のプローブは、上記配列を有するものであるが、それらだけに限定されるものではなく、配列番号1に示した配列に加え、それらの配列から誘導される15~35、好ましくは18~24ヌクレオチドのオリゴマーまたは相補的オリゴマーにより構成される配列を持つプローブをも含むものである。これらのプローブは、2種類以上のプローブを組み合わせて使用することができる。

【0014】オリゴヌクレオチド自動合成装置を用いてポリヌクレオチドプローブを合成する方法を以下に説明する。下記の規定配列を持つ34ヌクレオチド鎖長のポリヌクレオチドプローブをチオホスファイト法(特開昭61-180002)によって合成した。合成が完了したら、ポリヌクレオチドを担体から分離し、既知のクロマトグラフィー法によるC18カラムを用いたHPLCによって目的物を分取し、約99%の純度を持つポリヌクレオチドを得ることが出来た。作成したポリヌクレオチドを、電気泳動で35塩基の標準ポリヌクレオチドと比較し生成を確認した。

5' - ACATGTGATC AACAAACCCCA CGATCAGTAG AGTCA - 3'
上記の方法によって作成したポリヌクレオチドの塩基配列が正しいことを、既知のジデオキシ法によって確認した後、このポリヌクレオチドがカンピロバクター・ジェジュニ及びコリの16S rRNAに結合するかどうかを調べた。まず、カンピロバクター・ジェジュニから16S rRNAを、フェノール・クロロホルム抽出や、エタノール沈殿などの操作を行なうことによって抽出した。これと、作成したプローブを混合し、 α - ^{35}S -dATP存在下で逆転写酵素を作用させ、このプローブがプラ

イマーとなってcDNA伸長反応が進行していたことを、電気泳動法及びオートラジオグラフィーなどの方法を用いて確認した。この結果により、作成したポリヌクレオチドプローブは、標的としている16S rRNAを確認し、結合できることを確認した。

【0015】これらの核酸配列は、最初二重鎖である場合に必要であれば、変性された相補的DNAまたはRNA配列とハイブリッドを形成する性質を有している。核酸の変性は、塩基性培地中でのインキュベート、培地温度の上昇、これら2プロセスの組合せまたは再度マイクロ波の作用によって行なうことが出来る。ハイブリッドの形成は、様々な方法によって行なうことが出来る。

【0016】本発明のプローブは、核酸プローブの標識に関して当業者に公知の方法の一つによって標識される。例えば ^{32}P 等の放射性同位元素で標識されるか、または酵素などの非放射性同位元素で標識されるが、これも公知である。あるケースでは、プローブは酵素で標識されないが、但し例えばハイブリッド形成後に存在可能なビオチンで化学的に修飾される。

【0017】

【作用】本発明のプローブは、該プローブが試料中に存在するあらゆるカンピロバクター・ジェジュニ及びコリのrRNAとハイブリッド形成可能となる条件下で、該プローブを試料中の細菌と接触させることにより、核酸ハイブリッド複合体を形成し、該複合体を検出することにより、試料中のカンピロバクター・ジェジュニ及びコリの存在を検出することができ、試料中のカンピロバクター・ジェジュニ及びコリの存在を証拠だてることができる。特に、ほとんどの遺伝子は、rRNA〔タンパク質とRNAの複合混合物からなり、すべての生物において遺伝情報の翻訳に関与するものであり、細菌には3種の異なったリボソームRNA分子が存在する(5S, 16S, 23S)〕の多重コピーを有し(Noller(1984) Ann. Rev. Biochem. 53: 119)、各種細菌細胞は約1.2×10⁴個のリボソームを含むため、いずれの細胞も少なくとも1.2×10⁴分子の各rRNAを含むのに対し、細菌中の他の遺伝子は1細胞あたり1~2コピー存在するだけであり、しかも、そのmRNA産物は安定ではなく、常に転写されているわけではないため、ハイブリッド形成によるrRNAの検出は、他の遺伝子のDNAに対するハイブリッド形成に対して約10⁴倍感度がよいことになる。

【0018】

【実施例】配列番号1に示した配列と相同性を持つ以下の配列を有する3種のプローブ(CCJ31, CCJ32, CCJ33)を上記チオホスファイト方法で合成し、ハイブリッド形成アッセイによりカンピロバクター・ジェジュニ、コリ及び非カンピロバクタージェジュニ及びコリについて同定試験をおこなった。

10 20 30
 CCJ31; ACATGTGATC AACAAACCCA CGATCAGTAG AGTCA
 10 20 30
 CCJ32; AACCCCACGA TCAGTAGAGT CATTACGTGCG
 10 20 30
 CCJ33; GAGTCATTAC GTCGATTGCG TAATTACACAT GGC

試験の結果を表1に示した。表1で明らかな様に、これらのプローブは、カンピロバクター ジェジュニ及びコリに特異的であることが示され、非カンピロバクター

表1 細菌類の検出

ジェジュニ及びコリ由来のDNAあるいはRNAとはほとんどハイブリッド形成を行なわなかった。なお、表1に示した非カンピロバクター ジェジュニ及びコリの菌は、カンピロバクター ジェジュニ及びコリの検査において、検査対象となり得る菌種のうちの一部である。

【0019】

【表1】

	プローブ		
	CCJ31	CCJ32	CCJ33
カンピロバクター コリ	+	+	+
カンピロバクター ジェジュニ47	+	+	+
カンピロバクター ジェジュニ48	+	+	+
大腸菌	-	-	-
サルモネラ	-	-	-
リステリア	-	-	-
黄色ブドウ球菌	-	-	-
黄色ブドウ球菌TSS-1	-	-	-
綠膿菌	-	-	-

【0020】

【効果】本発明のプローブを用いたカンピロバクター ジェジュニ及びコリの検出は、迅速かつ正確な結果を与える、臨床や食品の検査室で、短時間のうちに標本中のカンピロバクター ジェジュニ及びコリの有無を調べることが出来る。又、本発明の検出方法は、他の様々な変動の多い生物学的性質ではなく細菌の核酸含量に依存するため、カンピロバクター ジェジュニ及びコリの生物学的に典型的な種のみならず、非典型的な種も検出可能であり、更に、本検出方法は検出に必ずしも生存している

細胞を必要としないため、検査室への標本の輸送のための輸送培地の必要性が除かれるという優れた効果を奏するものである。

【0021】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：73

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：16S rRNA

配列

XAAACGAXGX ACACXAGXXG XXGGGGXGCX AGXCAXCXCA GXAAAGCCAGC XAACGCAXXA 60
 AGXGXACCGC CXG 73